

Søknad om patent.

Søknadsskriv

1a - *lf*

Til

Patentstyret

Boks 8160 Dep.
0033 Oslo

Utfylles av Styret

Styret for pat.industriell eiendom	
Dato	Patentsøknad nr.
24.AUG 93	933009

Patentsøknad nr.

Inngivelsesdag

Alment tilgjengelig

Behandlermedlem

Int. Cl.

KD

E 11B

Søknadfullmektigs referanse
(angis hvis ønsket):

Alm. tilgj.

29 DES. 1994
1.500,00

24. aug 93 313842

P933009 1

Oppfinnelsens
benevnelse:Fremgangsmåte for produksjon av oljer med
høy oksidativ stabilitet fra marint råstoff

1d

Hvis søknaden er
en internasjonal søknad
som videreføres etter
patentlovens § 31:

Den internasjonale søknads nummer

Den internasjonale søknads inngivelsesdag

Søker:

Navn, bopel og adresse.
(Hvis patent søkes av flere,
opplysning om hvem som skal
være bemyndiget til å motta
meddelelser fra Styret på vegne
av søkerne).

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Norsk Institutt for Fiskeri- og Havbruksforskning
Postboks 2511
9002 Tromsø

Oppfinner:

Navn og (privat) adresse.

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Stig Jansson, Prestvatn.Studentheim C-324, Olavstien 8, 9012 Tromsø
Edel O. Elvevoll, Erik Vangbergs gt. 6, 9000 Tromsø

Fullmektig:

Hvis søknad tidligere
er inngitt i eller
utenfor riket:

(Fortsett om nødvendig på neste side)

Prioritet kreves fra dato	sted	nr.
Prioritet kreves fra dato	sted	nr.
Prioritet kreves fra dato	sted	nr.
Prioritet kreves fra dato	sted	nr.

Hvis avdelt søknad:

Hvis utskilt søknad:

Den opprinnelige søknads nr.	og dennes inngivelsesdag:
Den opprinnelige søknads nr. 922337	begjært inngivelsesdag. 28.06.93.

933009

Angivelse av tegnings-
figur som ønskes
publisert sammen med
sammendraget:

Fig. nr.

POSTADRESSE
Boks 8160 Dep.
0033 OsloKONTORADRESSE
Københavnsgt. 10
OsloTELEFON
22 38 73 00TELEKS
19152
nopat.nTELEFAKS
22 38 73 01POSTGIRO
0808 5170708BANKGIRO
1600.40.39916

Bilag:

(Krys av i
vedkommende rute)Deponert kultur av
mikroorganisme:Utlevering av prøve av
kulturen:

Søknadsavgift:

- ☐ Gjenpart av søknadsskrivet
- ☒ Beskrivelse, krav og sammendrag i 3 eksemplarer, eller
- ☐ for internasjonale søknaders vedkommende, oversettelse av den internasjonale søknad i 3 eksemplarer, jfr. patentlovens § 31.
- ☐ tegninger i 3 eksemplarer
(Antall)
- ☐ Fullmaktsdokument
- ☒ Overdragelsesdokument
- ☐ Dokumentasjon av begjært prioritet, jfr. patentforskriftenes § 11

☐ Søknaden omfatter kultur av mikroorganisme

☐ Prøve av den deponerte kultur av mikroorganisme skal bare utleveres til en særlig sakkyndig, jfr. patentlovens § 22 åttende ledd og patentforskriftenes § 25b første ledd

Grunnavgift i h.t. patentforskriftenes § 44 (f.t. kr. 1500).....

kr 1.500,-

Tilleggsavgift for krav utover 10: krav á kr. 350-
(antall)

kr

Evt. særskilt tilleggsavgift i h.t. patentforskriftenes

§ 44 nr. 3 c (f.t. kr. 2800) kr

Evt. ytterligere avgifter (spesifiser) kr

Sted og dato ... Tromsø, 19.08.1993.....

Egil O. Overøll
(Underskrift)

1/2

Styret for det industrielle rettsvern	
Dato	Patentsøknad nr.
24. AUG 93	933009

Patentsøker:

Norsk Institutt for Fiskeri- og Havbruksforskning A/S
(FISKERIFORSKNING)
Postboks 2511
9002 TROMSØ

Oppfinnere:

Stig Jansson
Prestvannet Studentheim D-317
Olastien 8
9012 Tromsø

Edel O. Elvevoll
Erik Vangbergs gt. 6
9000 Tromsø

Tittel:

"Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ
stabilitet fra marint råstoff."

Denne oppfinnelsen omhandler en fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet fra marint råstoff.

Marint fett er unikt i den forstand at det inneholder større mengder umettede fettsyrer, men det er nettopp mengden av umettede (spesielt flerumettede) fettsyrene som gjør marint fett utsatt for oksidasjon. Flerumettede fettsyrer oksiderer hurtigere enn monoumettede fettsyrer, enkelt sagt fordi det finnes flere angrepspunkter i molekylet. Lavtemperaturprosesser er derfor spesielt egnet for råstoff rikt på umettet fett.

Interessen for marint fett har vært økende siden Dyerberg og medarbeidere foreslo at den lave dødeligheten av hjertesykdommer (Coronary Heart Disease, CHD) blant eskimoene på Grønland kunne tilskrives deres marine kosthold¹. Interessen har særlig vært konsenterert omkring de flerumettede fettsyrene^{2,3} som det er spesielt mye av og som har unik plassering av dobbeltbindingene i marint materiale. Den siste tids fokusering på flerumettet fett som årsak til lavere dødelighet av hjertesykdommer har ført til stor kommersiell interesse for produkter med opprinnelse i marint fett. Et av de største problemene denne industrien står overfor er stabilisering av dette fett. I dag anvendes i stor grad vitamin E (dl- α -tocopherol) som stabilisator til disse produktene, men fremdeles synes oksidasjonen å være et problem.

Det arbeides idag med metoder for stabilisering av marint fett til bruk i næringsmidler som margarin, pølser, salatdressinger osv⁴⁻⁸. Ulike strategier som; forbedrede raffineringprosesser⁷, anvendelse av absorbenter, utvikling av emulsjoner med med høyt innhold av marint fett^{9,16}, mikroinnkapsling^{10,11} og anvendelse av forskjellige antioksidanter¹²⁻¹⁵ utprøves.

EFFEKTER AV OPPVARMING VED TRADISJONELL UTVINNING AV MARINE OLJER

Tradisjonell utvinning av tran

Dagens metoder for utvinning av tran, skjer ved at torskelever varmes opp, vanligvis ved hjelp av vanndamp, så mye at cellestrukturen ødelegges og proteiner denatureres. Denne "damping" av råstoffet fører til at tranen, som

ikke er løselig i vann, flyter opp og kan derfor skilles fra ved sentrifugering, pressing, flotasjon eller dekantering.

Tradisjonell utvinning av fiskeolje

Fiskeolje produseres som et biprodukt ved fiskemelproduksjonen. Kvaliteten på oljen reflekterer også dette. Prosessen for framstilling av råolje starter med våtpressing av råstoffet. Råstoffet varmebehandles, filtreres og fett sentrifugeres/separerer fra vannfasen. Dagens sildemelindustri bruker oppvarming til mellom 70-90°C for å denaturere proteinene og derved frigjøre fett. Alfa-Laval har gjennom utvikling av Condec-prosessen¹⁷ redusert tiden som råstoffet utsettes for høy temperatur og har derved fått en viss kvalitetsheving.

Effekter av varmebehandling

Varmebehandling forårsaker i tillegg til denaturering av proteiner, dekomponering av termisk labile antioksidanter, frigjøring av prooksidanter, inaktivering av enzymer som beskytter mot oksidasjon og termisk aktivering av oksidasjonsreaksjoner.

Termisk aktivering

Høy prosessstemperatur gir både tilførsel av store mengder energi for aktivering og høyere reaksjonshastigheter på oksidasjonsreaksjonene (autooksidasjon / fotooksidasjon / enzymatisk oksidasjon / polymerisasjon).

Termisk dekomponering av antioksidanter

Varmebehandling forårsaker aktivering av oksidasjonsreaksjoner enten rent termisk eller gjennom reduksjon av innhold av (termolabile) antioksidanter. Oppvarmingen fører til at naturstoffer som bidrar til å gjøre fett stabilt mot harskning inaktiveres.

Løselighet av lukt-, smaks- og farvestoffer

Ved høy temperatur har fett stor løselighet av komponenter som gir smak, lukt og farve i produktet.

Olje utvunnet på denne måten må derfor gjennomgå omfattende renseprosesser for å fjerne uønskede lukt- og smaksstoffer (raffinering) og siden naturlige antioksidanter er ødelagt ved utvinningsprosessen, må oljen stabiliseres mot harskning ved tilsetning av antioksidant.

Denaturering av proteiner

Ved varmebehandling inaktiveres enzymer som beskytter lipidene mot oksidasjon (catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase etc). Ved denaturering av proteiner ved varmebehandling vil metallioner frigjøres. Eksempler er ferritin og hemoglobin som ved denaturering frigjør jern. Ioner av transisjonsmetaller som jern (Fe^{3+}) og kopper (Cu^{2+}) er eksempler på sterke prooksidanter som bidrar til hurtigere oksidasjon av fett og derved lavere stabilitet.

Utvinning av olje ved hjelp av kaldpressing

Teknikker for "kaldpressing" ($30-50^{\circ}\text{C}$) av fett fra organisk materiale er utviklet. Ved produksjon av vegetabiliske oljer er dette en alternativ metode til ekstraksjon med organiske løsemidler. Kombinasjon av mekanisk bearbeiding og moderat økning av temperaturen utnyttes her for å drive ut fett. "Kaldpressing" har også vært anvendt ved produksjon av torskelevertran, men her blir ofte fett, i tillegg til den moderate oppvarmingen, utsatt for oppvarming til 90°C for å effektivisere separasjon i senere prosessstrinn.

OKSIDASJON

Oksidasjon av fett forårsaker forringelse av smak og lukt av de produkter hvor de inngår. Ved harskning går også biologisk virksomme komponenter tapt og det dannes harskningsprodukter (peroksider og radikaler) som kan være helseskadelige.

Oksidasjon av umettede fettsyrer er ingen enkeltreaksjon, men et komplekst system med flere reaksjoner med ulike reaksjonsveier og reaksjonsprodukter (autooksidasjon / fotooksidasjon / enzymatisk oksidasjon). Generelt fører tap av hydrogen fra dobbeltbindinger i umettede fettsyrer til dannelsen av frie radikaler som i kombinasjon med oksygen danner peroksidradikaler. Disse vil igjen reagere med fett og danne hydroperoksid hvilket er det primære mellomproduktet i autooksidasjonsprosessen. Peroksidene og peroksidradikalene er reaktive molekyler og kan enten dekomponere til mindre molekyler som aldehyder, hydrokarboner, estere, syrer og alkoholer eller oksidere videre med dannelsen av dihydroperoksider, epoksi-hydroperoksider og sykliske endoperoksider. En annen sentral reaksjonsvei er kombinasjon av frie radikaler med dannelsen av dimerer og polymere.

OPPFINNELSE

Målet med foreliggende arbeide er å stabilisere produktet, dvs. utsette det for minst mulig oksidativt stress ved produksjon. Dette kan best gjøres som følgende: kort gjennomløpstid fra råstoff til produkt, unngå luft (oksygen), bruk av vakuum og inert gass, unngå kontakt med jern og kopper (meget sterke prooksidanter), unngå lys og holde temperaturen lav under hele prosessen.

Konsekvensen av frysing er fokusert på ompakking av membranlipidene. For depotfettet som hovedsakelig består av triglyserider har frysingen ingen andre nevneverdige konsekvenser enn at volumet i fettvakuolene minsker med ca. 10 %. For membranlipidene derimot, kan ompakkingen direkte skade membranstrukturen. I membraner, som i sin opprinnelige form består av en flytende heterogen struktur av fosfolipider, gir frysing opphav til faseseparasjon, fosfolipidene utkrystalliseres som separate "øyer" i membranen. Denne faseseparasjonen er ikke reversibel og endringene påvirker membranens funksjon etter tining.

I fryst tilstand vil vann, fett og vev (celler) utgjøre en fast rigid struktur. Denne rigide strukturen av iskrystaller, cellemembran og fettvakuoler utnyttes ved den mekaniske bearbeidelsen av det fryste vevet. Denne effekten er så stor at det ikke er nødvendig med en sakte innfrysing. Elastisiteten i cellemembranene er i fryst tilstand borte og en har i fryst tilstand ikke muligheter til å fordele den kraft som utøves på vevet. Dette er nok for å knuse vevet slik at oljen kan utvinnes ved moderat oppvarming. For oppfinnelsens beste resultat er det således at innfrysingshastigheten er høy for å få en god kvalitet på oljen. På denne måten kuttes gjennomløpstiden ned og en utsetter oljen for færrest mulig angrep av prooksidative stoffer som er tilstede i leveren.

Ved sakte innfrysing vil færre kjerner dannes og derved større iskrystaller. Etterhvert vil saltkonsentrasjonen i cellene bli så høy at den i seg selv har prooksidative egenskaper. Økt enzymaktivitet er vist i temperaturområdet for isdannelse (-2 - 0° C). Dette er et argument for at en ved produksjon av stabile høykvalitative marine oljer må søke å gjøre innfrysingsprosessen så rask som mulig.

Ved den foreliggende oppfinnelse utsettes ikke råstoffet for temperaturbetingelser hvor uønskede smaks- og farvestoffer er løselige i fettfasen eller som ødelegger naturlige antioksydanter.

Dette oppnås ved at råstoffet først fryses hurtig inn slik at vannet i materialet danner mange små iskrystaller og cellemembranene og andre cellulære komponenter blir en fast rigid struktur.

Ved etterfølgende mekanisk bearbeidelse av råstoffet, ved f.eks. oppmaling, vil fettfasen enkelt, etter en moderat oppvarming kunne skilles fra protein-/vannfasen.

Fettet smelter ut og det kan da skilles fra resten ved pressing, flotasjon, dekantering eller sentrifugering.

Den oksydative stabiliteten økes ved bruk av lav prosessstemperatur da denne beskytter de naturlige antioksydantene og gir tilførsel av mindre energi for aktivering og derved bidrar til lavere reaksjonshastigheter for harskningsreaksjoner. Ved lav temperatur har fett i tillegg lav løselighet av komponenter som gir smak, lukt og farve til produktet.

Fett med høy grad av umetthet har lavt smeltepunkt. Metoden er derfor spesielt egnet for råstoff rikt på umettet fett.

Oksidasjon av oljer forårsaker forringelse av smak og lukt hos de produkter hvor de inngår. Ved harskning går også biologisk virksomme komponenter tapt og det dannes harskningsprodukter (peroksyder og radikaler) som kan være helseskadelige.

Ved tradisjonell utvinning der man bruker kraftig oppvarming av råstoffet for fettutskillelse, vil det gjenværende materialet (graksen) bestå av bl.a. denaturerte proteiner, herunder denaturert bindevev. Denne graksen har imidlertid dårlig næringsverdi som proteinkilde, pga. dårlig fordøyelighet. En alternativ metode for utvinning av fett ved lav temperatur gir en grakse med langt større næringsverdi. Ved denne lavtemperaturprosessen denatureres ikke proteinene og oksydasjon av lipidene hemmes. Denne graksen vil derfor være en god kilde både for fosfolipider og proteiner.

Formål

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en fremgangsmåte for stabilisering av fett, hindre fett i å oksydere ved utvinning noe som gjør det stabilt ved emballering, lagring, distribusjon og salg.

Et annet formål er å tilveiebringe en fremgangsmåte ved produksjon av en stabil marin olje som samtidig hindrer at lukt og smaksstoffer ekstraheres ut i fett fra det marine råstoffet.

Videre er det et formål å tilveiebringe en fremgangsmåte ved produksjon av fett som gir høyere anvendelighet av biprodukter og derved er miljøvennlig.

Metoden karakteriseres ved følgende fordeler:

1. Fettet som utvinnes har høy oksydativ stabilitet, er tilnærmet farveløs, har en mild og nøytral smak og høyere grad av umettetethet. *hvor høy?*
2. Lavere temperatur på fett gjennom utvinningen.
 - a. Antioksydanter denatureres ikke.
 - b. Lavere løselighet av lukt- og smaksstoffer i fett.
 - c. Prooksydanter frigjøres ikke.
 - d. Mindre grad av aktivering av kjemiske reaksjoner.
 - e. Lavere reaksjonshastigheter på oksydasjonsreaksjoner.
3. Høyt utbytte av fett ved utvinningen.
 - a. Effektiv sprengning av cellemembraner oppnås.
 - b. Koagulasjon av proteiner med påfølgende innkapsling av fett, unngås.
4. Bruk av organiske løsemidler unngås.

Eksempler:

Eksempel 1

180 g lever fra torsk (*Gadus morhua*) ble avkjølt og senere fryst til en kjernetemperatur på -6°C . Deretter ble leveren homogenisert i fryst tilstand. Fettet ble frigjort ved at råstoffet ble varmet opp til 6°C . Fett, vann og protein ble skilt ved at massen ble sentrifugert i 5 min. ved 3000 rpm. Utbyttet av fett ble ved bruk av denne metoden 84 %. Fettet som blir utvunnet, har høy oksydativ stabilitet; Peroksydverdi (PV) = 0.5 meq Anisidinverdi (AV) ≈ 0 , er tilnærmet farveløs, har en mild og nøytral smak og høyere grad av umettethet enn ved den tradisjonelle utvinningsprosessen.

For sammenligning ble fett fra 180 g torskelever utvunnet ved bruk av den tradisjonelle utvinningsprosessen, bruk av direkte damp. Utbyttet av fett ble ved bruk av denne metoden 81%. Fettet som ble utvunnet hadde Peroksydverdi (PV) ≈ 2 meq og Anisidinverdi (AV) ≈ 11 , er gul på farge, har en typisk transmak og lavere grad av umettethet enn ved den nye prosessen.

Eksempel 2

Muskel fra fersk laks (*Salmo salar*) ble fryst til -6°C og deretter homogenisert i fryst tilstand. Fettet ble frigjort ved at råstoffet ble varmet opp til 10°C . Fettet ble skilt fra vann og protein ved at massen ble sentrifugert i 10 min. ved 3000 rpm. Peroksydverdi (PV) og anisidinverdi (AV) ble bestemt til PV = 0.5 meq og AV ≈ 0 .

For sammenligning ble fett fra laksemuskel utvunnet ved bruk av en ikke-industriell metode (Bligh and Dyer, 1959)¹⁸. Fettet som ble utvunnet hadde Peroksydverdi (PV) ≈ 1 meq og Anisidinverdi (AV) ≈ 0 .

Eksempel 3

Muskel fra hel fryst makrell (*Scomber scombrus*) ble kjøpt fra en lokal matvarebutikk (hel fryst, kjernetemperatur -10°C) og homogenisert ved hjelp av en kvern. Fettet ble frigjort ved at råstoffet ble varmet opp til 10°C . Fett, vann og protein ble skilt ved at massen ble sentrifugert i 10 min. ved 3000 rpm. Peroksydverdi (PV) og anisidinverdi (AV) ble bestemt til $\text{PV} \approx 7$ meq og $\text{AV} \approx 1,2$. For sammenligning ble fett fra det innkjøpte makrellpartiet utvunnet ved bruk av en ikke-industriell metode (Bligh and Dyer, 1959)¹⁸. Fettet som ble utvunnet, hadde Peroksydverdi (PV) ≈ 35 meq og Anisidinverdi (AV) ≈ 7 .

Ansøkt om patent for
på 17.12.99.

10

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet fra marint biologisk råstoff, **karakterisert ved at** råstoffet fryses hurtig inn og knuses i fryst tilstand og fettutskilles ved svak oppvarming ~~inntil~~ fettutskillelsen blir flytende: ved at det smeltes ut fra råstoffet.
2. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet i henhold til krav 1. **karakterisert ved at** det marine råstoffet fortrinnsvis fryses inn hurtig slik at det dannes mange små iskrystaller og cellemembranene og andre cellulære komponenter blir en rigid struktur.
3. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet i henhold til krav 1-2, **karakterisert ved at** det marine råstoffet bearbeides mekanisk i fryst tilstand.
4. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet i henhold til krav 1-3 **karakterisert ved at** at fettutskillelsen frigjøres ved en svak oppvarming ved å smelte det ut fra råstoffet.
5. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet i henhold til krav 1-4 **karakterisert ved at** fettutskillelsen i flytende tilstand ved lav temperatur skilles uten pressing fra resten av det marine råstoffet.
6. Fremgangsmåte for produksjon av oljer med høy oksidativ stabilitet i henhold til krav 1-5 **karakterisert ved at** produksjonsprosessen foregår under inert atmosfære, er sikret lekkasje av metaller fra produksjonsutstyr og foregår uten tilgang av lys.

LITTERATUR

- 1 . Dyerberg, J. , Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S. og Vane, J. "Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis." Lancet ii. 1978, s. 117-119.
- 2 . Kromhaut, D., Bosschiter, E.B. og Coulander C. de.L. " The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease.", New Engl. Med. J., May 9 (312), 1985, s.1205-1209.
- 3 . Phillipson, B.E., Rothrock, D.W., Connor, W.E., Harris, W.S. og Illingworth, D.R. " Reduction of plasma lipids, lipoproteins and apoproteins by fish oils in patients with hypertriglyceridemia.", New Engl. Med. J., May 9 (312), 1985, s.1209-1212.
- 4 . Barlow, S.M., "The Challenges to the world Fish Oil Industri.", n-3 News, Unsaturated Fatty Acids and Health, Juni 1988, 3 (2), s.1-3.
- 5 . Young, F.K.V., " "The Challenges of Using Refined Fish Oil in Margarine", n-3 News, Unsaturated Fatty Acids and Health, Mars 1989, 4 (1), s.1-3.
- 6 . Chang, S.S., Challenges of the Deodorization of Fish Oil.", n-3 News, Unsaturated Fatty Acids and Health, October 1988, 3 (3), s.1-3.
- 7 . Heldal, J.A., "Raffinering av fiskeoljer.", Meldinger fra SSF, Nr.2 Okt. 1987, s.24-27.
- 8 . Ackman, R.G., "Concerns for utilization of marine lipids and oils." Food Technology, 42 (1988), s. 151.
- 9 . Hamazaki, T., Yamashita, N., Yokoyama, A., Sugiyama, E., Urakaze, M. og Yano, S., "Natural killer cells and Eicosapentaenoic Acid." Proceedings of the AOCS Short Course on Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids. (Eds. Lands, W.E.M.) May 14-17, Biloxi, Mississippi. (1987) s. 127.

10. Danochemo A.S. "Microencapsulated Omega 3 fatty acids."
Målparken 5. DK-2750 Ballerup, Danmark.
11. Fair, P.A. og Kiefer, R., " Microencapsulation of Fish oils and n-3 Ester Concentrates." n-3 News, Unsaturated Fatty Acids and Health, 1987, 2 (4), s.4.
12. Us Patent 4 525 306, " Method for prevention of Oxidation of oils and fats and soft capsules containng the treated oils and fats."
Oppfinner; Yajima, Y. 25. Juni 1985.
13. "Antioxidants" Preservatives, Food Technology, Sept. 1986, s.94.
14. Ackman, R.G. Foredrag ved A.O.C.S. annual meeting , New Orleans 1987 Abstract no. 215, J.A.O.C.S., 64 (5), 1987, s.666.
15. Premeeting Short Courses, Lipid Oxidation Biloxi 1987, A.O.C.S.
(proc. tilgjengelig)
16. "Tranpreparat" Patentsøknad levert patenstyret 18.09.89. Oppfinner: Myre, J.
17. Geir E. Søbstad., Marine oils: The Technology of Separation and Purification of marine oils", World Conference Proceedings; "Edible Fats and Oils Processing", (Eds. David R. Erickson), Am. Chem. Soc., Champaign, Illinois, 1990, s. 37.
18. Bligh, E.G. og Dyer, W.J., "A rapid method of total lipid extraction and purification", Can. J. Bioch. Phys., 37, 1959, s. 911-917.